Aus dem hygienischen Institut der Kgl. Universität Leipzig.
Direktor: Prof. Dr. Kruse.

Beiträge zur Untersuchung der Leukocytenstoffe.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe

einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Universität Leipzig

vorgelegt von

Gerhard Huhle
aus Leipzig.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

LEIPZIG,
Druck von Sturm & Koppe (A. Dennhardt),
1915.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät zu Leipzig vom 3. Mai 1915.

Referent: Herr Geheimer Medizinalrat Prof. Dr. Kruse.

Es war eine Tatsache, die benutzt wurde, über deren Wesen man aber nichts Genaues wußte, daß das Blut in offenen Gefäßen sich lange hielt, ohne faul zu werden. Man versuchte, sich die Sache theoretisch zu erklären, ohne aber experimentell darüber Aufschlüsse zu suchen. So schrieben 1874 Traube und Gscheidlen dem Sauerstoffgehalt des Blutes diese Wirkung zu. Trotzdem man in dieser Tatsache eigentlich wußte, daß das Blut keinen Nährboden im gewöhnlichen Sinne abgab, übertrug man das nicht auf den Organismus im allgemeinen, sondern glaubte, daß bei einer Infektion der Organismus je nach der Art der Mikroorganismen einen guten oder schlechten Nährboden abgäbe, und erklärte sich daraus den verschiedenen Verlauf einer Infektion. Erst im Jahre 1877 brach Nägeli mit dieser Anschauung. Die Mikroorganismen, so lehrte er, verhalten sich im Makroorganismus anders als auf totem Substrat. Wohl kommt es darauf an, ob sie wachsen oder nicht, aber das liegt nicht nur an ihnen, sondern der Organismus hat Kräfte, die dagegen arbeiten. Er prägte das Wort „Konkurrenzkampf". Welcher Art diese Kräfte waren, wußte er jedoch nicht. Da war es Metschnikoff, der

auf der Versammlung russischer Naturforscher und Ärzte in Odessa im Jahre 1883 dieser Lehre vom Konkurrenzkampf die Grundlage gab mit seiner Behauptung, daß bei der Heilung von Infektionskrankheiten die Freßtätigkeit der Leukocyten eine Hauptrolle spiele. Eine große Anzahl von Versuchen konnte diese Lehre stützen.

Im folgenden Jahre, 1884, fand Grohmann, der den gerinnungshemmenden Einfluß pflanzlicher Mikroorganismen auf das Blut untersuchen wollte, eine deutliche Wachstumshemmung. Damit war der Weg der experimentellen Blutuntersuchung außerhalb der Gefäße beschritten.

1887 konnte Fodor die Befunde Grohmanns bestätigen und erweitern, indem er nachwies, daß das Blut geradezu keimtötend wirkte. Nähere Untersuchungen zeigten, daß diese Wirkung dem Blute nicht nur als Ganzes zukam, sondern daß die Abtötung der Keime auch nach Entfernung aller Blutkörperchen fortbestand. Bitter und Nuttall kamen auf Grund ihrer Versuche zu der Ansicht, daß die Keime nach Abtötung durch das Serum nur als Leichname von den Leukocyten aufgenommen würden. Gleichzeitig wurden dabei die keimtötenden Stoffe des Serums näher untersucht, und Nuttall konnte feststellen, daß das Serum, welches 1 Stunde bei 55 Grad gehalten wurde, seine keimtötende Kraft verloren hatte. Zwar suchte Behring 1888 den Nachweis zu erbringen, daß das Rattenblut seine keimtötende Kraft nur seiner alkalischen Reaktion verdanke, aber die keimtötende Wirkung des Blutes war doch nach alledem soweit sichergestellt, daß Metschnikoff gezwungen war, wollte er seine Phagozytosetheorie aufrecht erhalten, dazu Stellung zu nehmen. Er stellte daher die Behauptung

auf, daß das Serum seine keimtötende Kraft durch den Zerfall der Leukocyten erhielte.

Damit eröffnete er der Untersuchung neue Bahnen, denn dann mußten ja die Leukocyten die Stoffe liefern, und man begann, diese nun daraufhin zu untersuchen.

Die Kenntnis der keimtötenden Serumstoffe wurde inzwischen immer weiter ausgebaut von Lubarsch, Fodor und vor allen Dingen von Buchner, der den Stoffen den Namen Alexine gab. Es standen sich so zwei Parteien gegenüber. Metschnikoff mit seinen Schülern vertrat die Phagozytosetheorie und Buchner und seine Anhänger die Humoraltheorie.

Es würde zu weit führen, wollten wir das Für und Wider der einzelnen Forscher hier anführen, uns geht vor allem die Rolle an, die die Leukocyten bei allen diesen Untersuchungen spielten.

Der erste, der die Frage der Alexinabstammung von den Leukocyten experimentell näher untersuchte, war Hankin 1892. Er fußte auf der Behauptung von Gengou, daß das Plasma des kreisenden Blutes frei von Alexin sei. Auf Grund von allerdings wenigen Versuchen kam er zu dem Ergebnis, daß die pseudoeosinophilen Leukocyten das Alexin lieferten, und daß ihre Körnchen die Muttersubstanz des Alexins darstellten; doch schon im folgenden Jahre widerlegte Mesnil diese Annahme durch die Tatsache, daß der Barsch, der doch keine pseudoeosinophilen Leukocyten hat, immun gegen Milzbrand sei. Immer häufiger begegnen wir nun der Annahme, daß die Leukocyten keimtötende Stoffe liefern. So finden wir 1893 bei Kruse: „Die Zellen sondern fortwährend antiseptisch wirkende Stoffe ab, die

in das Blut und in die Intercellularflüssigkeit übergehen und dort Modifikationen erleiden können." Buchner selbst untersuchte die Frage der leukocytären Alexinabstammung und kam zu der Überzeugung, daß die Leukocyten als Alexinspender anzusehen seien. Er war der erste, der die Leukocyten in größerer Menge gewinnen lehrte. Er spritzte Tieren Aleuronatbrei in die Pleurahöhle und erzeugte so ein leukocytenreiches Exsudat. So schuf er die Möglichkeit von Röhrchenversuchen mit Leukocyten. Eine andere Versuchsanordnung gebrauchte Hahn 1895. Er führte mit chemotaktischen Flüssigkeiten getränkte Wattebäusche in die Bauchhöhle von Meerschweinchen ein und gewann aus ihnen reichlich Leukocyten. Seine damit angestellten Versuche brachten auch ihn zu der Überzeugung, daß die weißen Blutkörperchen als Alexinspender anzusehen seien, und zwar glaubte er an eine vitale Sekretion des Alexins; jedoch gelang ihm ein Reaktivieren des durch Erhitzen inaktivierten Serums durch Leukocyten nicht.

Eine wesentliche Förderung erfuhr die Frage der Leukocytenstoffe durch Schattenfrohs eingehende Untersuchungen. Er vervollkommnete die Buchnersche Technik und führte vor allem das Waschen der Leukocyten in physiologischer Kochsalzlösung ein. So konnte er die keimtötende Kraft der Säfte ausschalten; ferner ließ er die Leukocyten mehrere Male gefrieren und wieder auftauen, um sie abzutöten und ihren Inhalt zu gewinnen. Aus seinen Untersuchungen ergab sich nun, daß die Leukocytenstoffe keimtötend wirken, daß sie durch Mazerieren bei 37 Grad im Auszug zu gewinnen sind, daß sie aber ein Erhitzen bis auf 80 Grad vertragen im Gegensatz zu den Alexinen, die

bei 57 Grad vernichtet werden. Das war ein tiefgreifender Unterschied zwischen den Leukocytenstoffen und den Alexinen, aber Schattenfroh hielt dennoch an der Buchnerschen Ansicht der Leukocytenabstammung der Alexine fest. Ebenso trat Bail dafür ein. So glaubte man die Alexine in den Leukocyten nachgewiesen zu haben, und es tauchte nun die Frage auf: Werden sie aus den Leukocyten bei deren Zerfall frei, oder besteht eine Sekretion? Buchner, Jakob, Schattenfroh, Trumpp, Van de Velde u. a. m. waren für die Sekretion, während Metschnikoff für ein Freiwerden durch Zerfall war. Die von Schattenfroh gefundenen Unterschiede zwischen Leukocytenstoffen und Alexinen wurden bald auch von anderen Forschern bestätigt, und allmählich häuften sich die Stimmen, die Zweifel in die Gleichheit beider setzten. Entweder, so schloß man, werden von den Leukocyten neben den Alexinen noch andere keimtötende Stoffe abgesondert, oder sie sind überhaupt nicht die Spender der Alexine. Schattenfroh selbst fand immer mehr Unterschiede; so zeigten sich die Leukocytenstoffe völlig unabhängig vom Salzgehalte der sie umgebenden Flüssigkeit im Gegensatz zu den Alexinen; auch gelang es nicht, das inaktivierte Serum mit Leukocyten zu reaktivieren. Er kam zu der Ansicht, daß die Leukocytenstoffe nicht gleich den Alexinen sind, daß diese aber aus ersteren hervorgehen. Für ihn waren also die Leukocytenstoffe das Umfassendere. Moxter, Däubler, Pfeiffer und Marx leugneten den Ursprung der Alexine aus den Leukocyten. Laschtschenko dagegen vertrat eine Sekretion der Alexine durch die Leukocyten, während Gruber sie zunächst als Umwandlungsprodukte der keimtötenden Zellstoffe ansprach,

dann aber ihre Herkunft aus den Leukocyten geradezu verneinte. Für die Leukocytenabstammung wiederum waren Trommsdorf, der an Sekretion glaubte, und Yoshinaga; noch andere waren der Ansicht, daß nur ein Teil des Alexins, das Komplement, von den Leukocyten stamme, so Pettersson und Weil.

In neuester Zeit ist man aber immer mehr zu der Ansicht gekommen, daß die Leukocyten das Alexin nicht liefern; besonders wichtig waren dabei die Versuche an Meerschweinchen mit Cholera und Schweinerotlauf. Gruber, Kruse, Schneider, Weil und die meisten anderen Forscher stehen heute auf dem Standpunkte, daß Alexin und Leukocyten nichts miteinander zu tun haben.

Ist somit die Frage nach der Alexinabstammung von den Leukocyten als gelöst zu betrachten, und zwar im verneinenden Sinne, so ist bei dem Studium dieser Frage jedoch ein ganz neues Gebiet erschlossen worden: Die keimtötende Kraft der Leukocyten.

Die Leukocyten liefern keimtötende Stoffe, das war sicher festgestellt; und diese Stoffe haben Eigenschaften, die sie von den Alexinen unterscheiden.

Das waren hauptsächlich folgende Punkte:

1. Die keimtötenden Leukocytenstoffe sind auch außerhalb der Leukocyten nachweisbar, es ist jedoch unentschieden, ob sie durch Zerfall der Leukocyten oder durch vitale Sekretion ins Blut gelangen.

2. Sie vertragen höhere Temperaturen als Alexine.

3. Sie sind nicht reaktivierbar wie Alexine.

4. Sie sind unabhängig vom Salzgehalte der sie umgebenden Flüssigkeit im Gegensatz zu den Alexinen.

So standen die Kenntnisse über die Leukocytenstoffe ums Jahr 1900. Eine Menge von Forschern beschäftigte sich in der Folgezeit mit dem genaueren Studium dieser Stoffe.

Nur die hauptsächlichsten Fortschritte seien im Auszuge mitgeteilt; Näheres siehe Schneider (Lit.-Verz. 95).

Gruber (1901) fügte den obengenannten Eigenschaften der Leukocytenstoffe eine neue hinzu, indem er feststellte, daß das Leukocytenextrakt nicht haemolytisch wirkt.

Die Frage, ob die Leukocytenstoffe durch Sekretion oder Zerfall frei werden, ist viel erörtert worden, und heute noch finden sich Vertreter beider Anschauungen; Lazar fand ein Freiwerden durch Zerfall und zeigte dabei, daß die Vitalfärbung der Leukocyten nach Nakanishi keinen Beweis für ihre Lebensfähigkeit erbrachte. Auch Pettersson und Kling waren für ein Freiwerden durch Zerfall. Dagegen stand eine Reihe anderer Untersucher auf dem Standpunkte, daß die Stoffe ohne Zugrundegehen der Leukocyten frei würden und zwar entweder durch spontane Abgabe oder durch den Reiz der Bakterien. Es sind da zu nennen: Chrom (Reiz), Futaki (Reiz), Gozony (Reiz), Gruber (Reiz), Laschtschenko (Sekretion), Schneider (Sekretion) und Weil-Nunokawa (Reiz).

Die Frage, ob die Leukocytenstoffe komplexer Natur sind, war eine Zeitlang umstritten. Pettersson z. B. behauptete, daß Leukocyten auf inaktives Serum aktivierend wirken, daß mithin die Leukocytenstoffe komplex seien, ebenso Kling. Spät aber konnte beweisen, daß eine Komplexität im Sinne Bordets nicht besteht, da an sich unwirksame Leukocytenmengen inaktives Serum nicht wieder wirksam machen.

Die Leukocytenstoffe gehen ferner nicht durch das Pukallfilter hindurch (Petterson und Kling).

Welche Temperatur die Leukocytenstoffe vertragen, ohne vernichtet zu werden, ist noch nicht eindeutig bestimmt; nur soviel steht fest, daß die Temperatur höher liegt als bei den Alexinen. Pettersson nennt 80 Grad, später sogar über 100 Grad, Schneider 75 Grad, ebenso Kling; jedoch vertragen nach Untersuchungen des letzteren die Leukocytenstoffe in trockenem Zustande noch höhere Temperaturen.

Das Verhalten der Leukocytenstoffe zu den Aggressinen ist auch Gegenstand der Untersuchung gewesen. Gruber-Futaki und Weil glaubten an keine Bindung, während Chrom und Kruse-Meissner eine Paralysierung fanden; nach Meissner ist deshalb eine grundsätzliche Trennung zwischen Leukocytenstoffen und Alexinen nicht nötig.

Der heutige Stand der Kenntnisse über die Eigenschaften der Leukocytenstoffe ist kurz zusammengefaßt folgender:

1. L-St sind außerhalb der Leukocyten nachweisbar.
2. L-St werden erst bei ungefähr 80 Grad vernichtet.
3. L-St sind nicht komplex.
4. L-St sind unabhängig vom Salzgehalte der sie umgebenden Flüssigkeit.
5. L-St gehen nicht durch das Pukallfilter.
6. L-St sind nicht globulicid (Schneider, Gruber).
7. L-St wirken nicht opsonisch (Schneider),
8. L-St werden durch Röntgenstrahlen vernichtet (Kling).
9. L-St sind leicht absorbierbar (Gips, tote Bakt.) (Weil).
10. L-St sind unlöslich in Alkohol (Pettersson, Schneider).

Die aus Kruses Laboratorium hervorgegangenen Arbeiten über Leukocytenstoffe von Bürgers, Esch, Meissner und Schallert hatten zunächst gezeigt, daß die Röhrchenversuche sich nur beschränkt anwenden lassen. Es ist dazu eine reichliche Menge von Leukocyten nötig, diese aber sind wiederum nur zu gewinnen durch Erzeugung eines leukocytenreichen Exsudats, z. B. mit Bouillon. Da es aber entschieden notwendig ist, wenn man die Eigenschaften der Leukocytenstoffe untersuchen will, diese in ihrer ursprünglichen Umgebung zu untersuchen, und die Lebensbedingungen der Zellen möglichst wenig zu verändern, da ferner die Exsudatmethode sich nur bei Tieren anwenden läßt, so haben wir uns zunächst die Aufgabe gestellt, nach einer Prüfung der Versuchsanordnung im allgemeinen, wenn möglich eine für Mensch und Tier gemeinsam anwendbare zu finden und diese so auszubauen, daß sie genau so anwendbar ist wie die mit dem Röhrchen. In zweiter Linie sollten die weißen Blutkörperchen möglichst rein aus dem Blute selbst gewonnen werden. Zum Schluß sei dann noch eine Reihe von früher angestellten Versuchen angeführt, die eine Gewinnung der Leukocytenstoffe in möglichst starker Form zum Ziel hatten.

Versuchsanordnung.

Bei den Röhrchenversuchen haben wir uns ausschließlich an die Anordnung gehalten, wie sie Esch (Lit.-Verz. 31) beschrieben hat, und die sich mit nur geringen Ausnahmen an die von Weil geübte anlehnt.

Als Versuchstier diente das Meerschweinchen und als Bakterium ein Dysenteriestamm „Foerster" aus der Sammlung des Instituts. Seine Virulenz betrug zur Zeit der Versuche $^1/_2$ Agarkultur.

Als Aufschwemmungsflüssigkeiten benutzten wir:

1. Aktives Serum vom Meerschwein. Wir stellten eine 5 % und eine 20 % Verdünnung her und benutzten dazu entweder 0,85 % NaCl-Lösung oder Lockesche Lösung.
2. Inaktives Serum, das durch Erwärmen $^1/_2$ Stunde lang bei 58—60 Grad inaktiviert wurde.
3. 0,85 % NaCl-Lösung.
4. Lockesche Lösung, die ihrem Salzgehalt nach dem Serum des Meerschweinchens möglichst ähnlich gemacht ist.
5. Nährbouillon.

Die gefrorenen Leukocyten wurden nach Buchners Angaben hergestellt; der Auszug (Digest Schneiders) wie bei Esch nach Schneider.

Die Bakterien wurden mit den Leukocyten, wenn nichts anderes erwähnt ist, 6 Stunden zusammen gelassen.

Die Aussaatmenge wurde genau ermittelt, indem stets 2 oder 3 Aussaatplatten hergestellt wurden. Als Aussaat galt dann das Mittel.

Versuche.

Zunächst lag uns daran, die Fehlergrenze bei den Versuchen festzustellen, um bei den späteren Tropfenversuchen die Ergebnisse richtig auswerten zu können. Zu dem Zwecke wurden mehrere Versuche doppelt angesetzt und unter gleichen Bedingungen verarbeitet. In folgenden Tabellen bedeutet NaCl 0,85 % Kochsalzlösung und L-L Lockesche Lösung.

Versuch I.

NaCl als Verdünnungsflüssigkeit.			L-L als Verdünnungsflüssigkeit.		
NaCl	35720	31920	L-L	∞	∞
akt. Ser. 5 %	2432	1024	akt. Ser. 5 %	58	34
„ „ 20 %	1	2	„ „ 20 %	0	29
„ „ conc.	3	9	„ „ conc.	12	25

Aussaat: 7445.

Versuch II.

Nur Lockesche Lösung als Verdünnungsflüssigkeit.

L-L	∞	∞	∞
akt. Ser. 5 %	736	1037	3344
„ „ 20 %	55	42	46
„ „ conc.	6	5	3

Aussaat: 15884.

Versuch III.

NaCl als Verdünnungsflüssigkeit.			L-L als Verdünnungsflüssigkeit.		
Leb. L. NaCl	67	160	Leb. L. L-L	493	320
akt. Ser. 5 %	93	525	akt. Ser. 5 %	806	186
„ „ 20 %	112	832	„ „ 20 %	320	268
„ „ conc.	262	0	„ „ conc.	283	160

Kontrolle: NaCl	∞	Kontrolle: L-L	∞
(ohne Leuk.) akt. Ser. 5%	5600	(ohne Leuk.) akt. Ser. 5%	2584
„ „ 20%	18	„ „ 20%	3500
„ „ conc.	8	„ „ conc.	0

Aussaat: 38000.

Deutlich geht aus diesen Versuchen hervor, daß bei gleicher Anordnung annähernd die gleichen Resultate zustande kommen; natürlich ist für die Beurteilung der Ergebnisse die Menge der Aussaat von ausschlaggebender Bedeutung, und die Zahlen sind nur im Verhältnis zu ihr zu bewerten. Hat man z. B. wie in Versuch I eine Aussaat von ungefähr 7500, so ist wenig Unterschied in der Wirkung, wenn wir nach 6 Stunden 1000 oder 2000 Keime finden. Es ist eben eine Abtötung zu verzeichnen, die man stark nennen kann, wenn man drei Arten unterscheidet, eine schwache, starke und sehr starke. Es gibt also das Plattenverfahren im Anschluß an den Röhrchenversuch bei gleichem Material auch die gleichen Ergebnisse.

Des weiteren sollte festgestellt werden, ob ein wesentlicher Unterschied in der Wirkung eintritt, wenn NaCl oder L-L als Wasch- und Verdünnungsflüssigkeit benutzt wird. Wir verfuhren folgendermaßen: Ein mit Bouillon intraperitoneal eingespritztes Meerschweinchen wird unter Wahrung der Keimfreiheit eröffnet und mit einer Pipette die Exsudatflüssigkeit in zwei verschiedene Gläser verteilt, das Waschen dann mit NaCl und L-L getrennt in jedem Gläschen vorgenommen, die Leukocyten verteilt und dann ebenfalls mit den entsprechenden Serumverdünnungen aufgefüllt.

Versuch IV.

NaCl als Verdünnungsflüssigkeit.		L-L als Verdünnungsflüssigkeit.	
Leb. L. NaCl	11	Leb. L. L-L	50
akt. Ser. 5 %	52	akt. Ser. 5 %	16
„ „ 20 %	106	„ „ 20 %	34
„ „ conc.	77	„ „ conc.	42
Kontrolle NaCl	76000	Kontrolle L-L	56240
akt. Ser. 5 %	1820	akt. Ser. 5 %	46
„ „ 20 %	640	„ „ 20 %	11
„ „ conc.	7	„ „ conc.	8

Aussaat: 2888.

Versuch V.

NaCl als Verdünnungsflüssigkeit.		L-L als Verdünnungsflüssigkeit.	
Leb. L. NaCl	47	Leb. L. L-L	300
akt. Ser. 5 %	9	akt. Ser. 5 %	1560
„ „ 20 %	236	„ „ 20 %	600
„ „ conc.	240	„ „ conc.	1
Kontrolle NaCl	∞	Kontrolle L-L	36000
(Ohne Leuk.) akt. Ser. 5 %	∞	(Ohne Leuk.) akt. Ser. 5 %	240
„ „ 20 %	0	„ „ 20 %	0
„ „ conc.	0	„ „ conc.	0

Aussaat: 9240.

Versuch VI.

NaCl als Verdünnungsflüssigkeit.		L-L als Verdünnungsflüssigkeit.	
Leb. Leuk. NaCl	339	Leb. L. L-L	1101
akt. Ser. 5 %	39	akt. Ser. 5 %	1056
„ „ 20 %	71	„ „ 20 %	416
„ „ conc.	416	„ „ conc.	339

Kontrolle NaCl	∞	Kontrolle L-L	∞
(Ohne Leuk.) akt. Ser. 5 %	∞	(Ohne Leuk.) akt. Ser. 5 %	∞
„ „ 20 %	2477	„ „ 20 %	237
„ „ conc.	25	„ „ conc.	24

Aussaat: 18291.

Zu diesen letzten drei angeführten Versuchen gehört auch Vers. III. Bei der Launenhaftigkeit der Röhrchenversuche, die wohl auf die Verschiedenheit des Materials zurückzuführen ist, läßt sich nur schwer ein rechtes Bild gewinnen; immerhin ist ein deutlicher Unterschied zwischen NaCl und L-L in der Wirkung nicht festzustellen, wenn es auch manchmal den Anschein hat, als ob die Leukocyten in NaCl um Geringes besser wirkten. Aus den geringen Zahlenunterschieden läßt sich ein sicherer Schluß nicht ziehen, wir haben jedenfalls zu den weiteren Versuchen nur die Lockesche Lösung gebraucht.

Wie schon eingangs erwähnt, sind die Röhrchenversuche mit Leukocyten zwar in ihrer Technik bequem und führen auch zu gleichmäßigen Ergebnissen, aber sie sind nur beschränkt anwendbar. Es machte sich das Bedürfnis geltend, eine Methode zu besitzen, die bei allen Tieren und auch beim Menschen anwendbar ist, und die es ermöglicht, mit den aus dem Blute unmittelbar gewonnenen Leukocyten auszukommen. In Kruses Laboratorium hatte Schallert schon mit Menschenleukocyten Versuche angestellt und dazu eine Methode benutzt, die man als „hängender Tropfen" bezeichnen kann. Es war nun unsere Aufgabe, diese Methode auszubauen und sie für möglichst alle im Röhrchenversuch geübten Anordnungen anwendbar zu machen.

Wir verfuhren folgendermaßen: Der ganze Versuch wird, wie schon der Name sagt, im Tropfen angesetzt, jedoch benutzten wir nicht wie Schallert den hängenden Tropfen, sondern wir nahmen zwei hohle Objektträger, deren Oberfläche eben geschliffen war, und die wir mit keimfreier Vaseline abdichteten. In dem zwischen den beiden Aushöhlungen entstehenden Raume setzten wir die Versuche an. Alle Glasteile waren vorher sterilisiert. Die Ausführung im einzelnen: In die Höhlung eines Objektträgers wurden mit einer Platinöse 1 Öse Leukocyten und 1 Öse L-L Serum oder Serumverdünnung gebracht, wobei zu beachten ist, daß die Öse immer gleich voll sein muß, d. h. daß man sie entweder an der Glaswand des Entnahmeröhrchens antippt und sie so, wenn man so sagen darf, gestrichen voll nimmt, oder daß man den in der Öse haftenden Tropfen unberührt benutzt; erstere Art gibt gleichmäßigere Ergebnisse. Beim Abstreichen der Öse am Objektträger muß man darauf bedacht sein, daß die Öse sich vollständig entleert. Bei den Kontrollen tritt an die Stelle der Öse mit Leukocyten eine Öse L-L oder physiologische NaCl Lösung. Es sind so wie beim Röhrchenversuch gleiche Mengen Material zusammengebracht.

Was nun die Aussaat anbetrifft, so kommt im Röhrchenversuch auf 6 Tropfen ein Kapillartropfen. Rechnet man 2 Kapillartropfen gleich 1 Tropfen, so ergibt sich ein Verhältnis 1 : 12. Im Deckglasversuche müssen nun, soweit möglich, entsprechende Verhältnisse geschaffen werden, wenn man beide Versuchsarten unmittelbar vergleichen will; an und für sich ist ja die Aussaatmenge, wenn man nur mit der einen Versuchsart arbeitet, gleichgültig, nur muß

man immer nach demselben Grundsatze verfahren. Im Röhrchenversuch ist, wie oben gesagt, das Verhältnis 1 : 12. Wenn wir nun einen gewöhnlichen Tropfen zur Aussaat benutzen, so ändert es sich in 1 : 6. Im Tropfenversuch sind 2 Ösen Flüssigkeit vorhanden, es muß also die Aussaat $^1/_3$ Öse betragen, um auch hier das gleiche Verhältnis zu erzielen. Deshalb wurde zur Aussaat eine kleine Öse benutzt, deren Fassungsvermögen nach Gewichtsbestimmung annähernd $^1/_3$ der größeren Öse war, im Röhrchenversuch aber ein gewöhnlicher Tropfen.

Mit dieser Öse wurden die Tropfen geimpft, der andere Objektträger mit der Aushöhlung nach unten darüber gelegt, angedrückt, damit durch die Vaseline ein luftdichter Abschluß erzielt würde, und das Ganze in einer feuchten Kammer 6 Stunden im Brutschrank gelassen. Nach dieser Zeit wurde der obere Objektträger vorsichtig abgehoben, die Vaseline mit keimfreiem Tupfer vom unteren entfernt und mit Äther und Alkohol die Umgebung der Höhlung sorgfältig gereinigt; nach dessen Verdunstung wurde 1 Tropfen Bouillon zu dem Versuchstropfen zugesetzt und mit keimfreier Öse das Ganze verrieben; 2cc Bouillon spülen es dann in eine keimfreie Petrischale, in der es dann zur Agarplatte verarbeitet wird.

Mit dieser Methode kann man alle Versuche wie im Röhrchen ausführen, braucht nur wenig Leukocyten und bekommt, wie einige Beispiele aus einer größeren Versuchsreihe zeigen, die gleichen Ergebnisse wie im Röhrchenversuch.

Diese Tropfenmethode ist ohne weiteres für lebende, gefrorene und erhitzte Leukocyten anwendbar, nur der Auszug machte Schwierigkeiten; wir haben deshalb auch

dafür eine Anordnung ausgearbeitet. Die Technik ist bei den kleinen Mengenverhältnissen etwas schwierig, aber nach einiger Übung gelang uns die Ausführung fast jedesmal.

Der Ausbruch des Krieges verhinderte uns leider daran, Versuche damit anzustellen; die Methode sei jedoch angeführt.

Wie im Röhrchenversuch wird beim Auszug auch hier die Flüssigkeitsmenge vermehrt. Wir nahmen 3 nicht abgestrichene Ösen Flüssigkeit auf eine abgestrichene Öse Leukocyten. Als Behälter benutzten wir während des Ausziehens nicht den hohlen Objektträger, sondern Blockschälchen, die eben geschliffen waren und durch eine Glasplatte mit Vaseline verschlossen wurden. Nach dem Stehen im Brutofen Reinigung der Umgebung wie oben und Verreiben mit keimfreier Öse. Dann wurde das Ganze möglichst vollständig in eine enge Kapillare gesaugt, sodaß es ungefähr 2 cm vom untern Ende derselben entfernt stand, die Kapillare unten zugeschmolzen und vorsichtig zentrifugiert. Darnach waren die Leukocyten im untern Ende und darüber die Flüssigkeit. Kurz über den Leukocyten wurde die Kapillare mit einer Feile geritzt und abgebrochen, die Flüssigkeit aus der Kapillare in die Höhlung eines Objektträgers gebracht und dann geimpft. Die weitere Verarbeitung erfolgte dann wie oben beschrieben.

Aus einer Reihe von Kontrollversuchen zur Tropfenanordnung seien einige Beispiele angeführt.

Zunächst ein Parallelversuch mit dem Tropfen allein, um festzustellen, ob auch bei diesen viel kleineren Mengen auf so feine Unterschiede, wie sie in zwei verschiedenen Seren gegeben sind, reagiert wird.

Versuch VII.

Nur Tropfenversuche, nur Exsudatleukocyten.

Leb. Leuk.	L-L		5	Leb. Leuk.	L-L		7
(Ser. eines	akt. Ser.	5 %	9	(Ser. des	akt. Ser.	5 %	3
anderen Tiers)	„ „	20 %	0	Tiers mit d.	„ „	20 %	4
	„ „	conc.	3	Exsudat)	„ „	conc.	11
Kontrolle	L-L		∞	Kontrolle	L-L		∞
(Ser. wie ob.)	akt. Ser.	5 %	∞	(Ser. wie ob.)	akt. Ser.	5 %	∞
	„ „	20 %	7		„ „	20 %	80
	„ „	conc.	1		„ „	conc.	20

Aussaat: 579.

Es entspricht also das Ergebnis hier in seiner Feinheit völlig dem im Röhrchenversuch.

Dann zwei Parallelversuche zwischen Tropfen und Röhrchen, und zwar wurde die Einwirkungszeit bei dem ersten auf 2 Stunden bemessen, bei dem anderen auf 6 Stunden, um festzustellen, ob für die kleineren Verhältnisse beim Tropfenversuch auch eine kürzere Einwirkungszeit besser wäre.

Versuch VIII.

Einwirkungszeit auf Bakterien nur 2 Stunden.

Tropfenversuch.				Röhrchenversuch.			
Leb. L.	L-L		21	Leb. L.	L-L		188
	akt. Ser.	5 %	17		akt. Ser.	5 %	220
	„ „	20 %	16		„ „	20 %	186
	„ „	conc.	24		„ „	conc.	156
Gefror. L.	L-L		303	Gefror. L.	L-L		3800
	akt. Ser.	5 %	704		akt. Ser.	5 %	5776
	„ „	20 %	192		„ „	20 %	6080
	„ „	conc.	346		„ „	conc.	140

Kontrolle L-L	2128	Kontrolle L-L	∞
(ohneLeuk.) akt. Ser. 5 %	1976	(ohn.Leuk.) akt. Ser. 5 %	39520
„ „ 20 %	288	„ „ 20 %	832
„ „ conc.	0	„ „ conc.	456
Aussaat: 6980.		Aussaat: 42940.	

Versuch IX.

Einwirkungszeit auf Bakterien 6 Stunden.

Tropfenversuch.		Röhrchenversuch.	
Leb. Leuk. L-L	32	Leb. L. L-L	385
akt. Ser. 5 %	125	akt. Ser. 5 %	448
„ „ 20 %	2	„ „ 20 %	736
„ „ conc.	1	„ „ conc.	550
Gefror. L. L-L	116	Gefror. L. L-L	1064
akt. Ser. 5 %	512	akt. Ser. 5 %	416
„ „ 20 %	268	„ „ 20 %	3192
„ „ conc.	128	„ „ conc.	1500
Kontrolle L-L	∞	Kontrolle L-L	∞
(ohn. Leuk.) akt. Ser. 5 %	1280	(ohn.Leuk.) akt. Ser. 5 %	11069
„ „ 20 %	27	„ „ 20 %	2736
„ „ conc.	6	„ „ conc.	2182
Aussaat: 7432.		Aussaat: 44080.	

Man sieht schon aus diesen beiden Versuchen, daß wesentliche Unterschiede nicht auftreten, und daß auch bei 6stündiger Einwirkung der Tropfenversuch dem Reagenzglasversuche entsprechende Ergebnisse zeitigt. Der Tropfenversuch ist also sehr wohl imstande, für den Röhrchenversuch einzutreten.

Der Grund, warum der Tropfenversuch so ausgearbeitet

wurde, war, wie oben erwähnt, der, daß zu Versuchen mit menschlichen Leukocyten nur kleine Mengen verfügbar sind. Bei der Darstellung der Leukocyten aus dem Blute verfuhren wir folgendermaßen: Wir benutzten auch hierzu das Meerschweinchen und gewannen das Blut durch Herzpunktion. In ein Centrifugenröhrchen kamen 1-2cc einer 3 % Natriumcitratlösung. Unter Schütteln wurden dazu bis 10cc Blut gesetzt, das Ganze dann zentrifugiert. Darnach finden sich im Röhrchen 3 Schichten, zu oberst das Serum, dann eine dünne weiße Schicht, die Leukocyten, und zu unterst die Erythrocyten. Mit einer feinen Pipette wurde der weiße Saum abgehebert und in ein engeres Zentrifugenglas, dessen Weite ca. 5 mm war, gebracht und mit L-L, zu der auch 1cc Na-Citr. auf 10cc gesetzt war, aufgeschwemmt. Erneutes Zentrifugieren. Wieder wird die weiße Schicht abgehebert; die rote Schicht wird immer schmäler, bis nach 3—4maligem Waschen nur noch Spuren roter Blutkörperchen vorhanden sind. Bei jedem neuen Waschen wurde der L-L weniger Citrat zugesetzt und zuletzt mit reiner L-L gewaschen. Es gelang so, die weißen Blutkörperchen in einer Menge zu gewinnen, die es bequem ermöglichte, eine Reihe von Tropfenversuchen zu machen. Das Waschen und die Trennung der Leukocyten von den Erythrocyten halten wir für nötig, denn wenn man mit der Öse in die weiße Schicht unmittelbar taucht, so wechselt die Leukocytenzahl beträchtlich, auch wenn man den Saum nur 3—4mal benutzt.

Wir hatten vor, zu untersuchen, ob ein Unterschied zwischen Blutleukocyten und Exsudatleukocyten besteht, kamen aber nicht dazu, da der Krieg ausbrach; nur 1 Versuch wurde vollendet, er sei hier angeführt.

Versuch X.

Tropfenversuch. (Blutleukocyten.) (Serum vom Tier mit Exsudatleuk.)		Röhrchenversuch. (Exsudatleukocyten.) (Serum vom Tier mit Exsudatleuk.)	
Leb. Leuk. L-L	15	Leb. Leuk. L-L	25
akt. Ser. 5 %	80	akt. Ser. 5 %	19
„ „ 20 %	17	„ „ 20 %	31
„ „ conc.	9	„ „ conc.	1
Kontrolle L-L	∞	Kontrolle L-L	∞
(ohne Leuk.) akt. Ser. 5 %	30	(ohne Leuk.) akt. Ser. 5 %	86
„ „ 20 %	45	„ „ 20 %	0
„ „ conc.	8	„ „ conc.	1
Aussaat: 589.		Aussaat: 3180.	

Wenn wir aus den bisher angeführten Versuchen uns über die Wirksamkeit der Leukocytenstoffe ein Bild zu machen suchen, so kommen wir zu folgendem Ergebnisse:

I. Die L-St. sind überall deutlich wirksam, selbst in konzentriertem Serum ist die Wirkung zu erkennen; (Vergl. Vers. VIII u. IX.) Am deutlichsten ist sie ohne Serumzusatz und bei 5 % Serum; bei 20 % und am meisten bei konzentriertem Serum ist die Kontrolle oft stärker keimtötend als Leukocyten und Serum zusammen. Es entspricht das einer von Kruse und seinen Schülern schon öfter beobachteten Tatsache. Als Grund dafür kann man vielleicht annehmen, daß von den Leukocyten Stoffe abgesondert werden, welche die Alexine neutralisieren.

II. Lebende Leukocyten wirken stärker als gefrorene, jedoch ist bei letzteren auch eine deutliche Wirkung

zu verzeichnen. Es lassen sich also die L-St. durch Gefrieren und Auftauen gewinnen. Die Neutralisierung der Alexine ist bei den gefrorenen Leukocyten nicht so augenscheinlich.

Wir haben noch eine Reihe von Versuchen gemacht, die teils der Wirkung der Auszüge galten, teils eine möglichst starke Gewinnung der Leukocytenstoffe verfolgten. Zu einem endgültigen Ergebnisse sind wir nicht gekommen, da wir die Versuche abbrechen mußten; es sollen jedoch einige hier angeführt werden.

Versuch XI.

Anordnung: Leukocyten und Serum wurden von 2 Meerschweinchen gewonnen und zusammen verarbeitet. Der ganze Versuch enthält nur ½ stündige Auszüge; die Leukocytenreste sind nicht verarbeitet. Die unter B angeführten Versuche sind vor dem Impfen ½ Stunde bei 58—60 Grad gehalten worden. Die Kontrollen haben während der Zeit des Ausziehens auch im Brutofen gestanden. Für den ersten Teil des Versuchs wurde die Einwirkungszeit auf die Bakterien auf 2 Stunden, für den zweiten Teil, der die gleichen Einzelversuche enthält, auf 6 Stunden festgesetzt.

Einwirkungszeit auf Bakterien 2 Stunden.

A.			B.		
Auszug von leb. Leuk.	L-L	1736	Auszug von leb. Leuk.	L-L	9000
	Ser. 5 %	1302		Ser. 5 %	10080
	„ 20 %	1092		„ 20 %	11400
	„ conc.	1178		„ conc.	10800

Kontrolle	L-L		25200	Kontrolle	L-L	38400
	Ser.	5 %	7320		Ser.	5 % 8760
	„	20 %	657		„	20 % 13920
	„	conc.	108		„	conc. 10800

Einwirkungszeit auf Bakterien 6 Stunden.

	A.			B.		
Auszug von	L-L		403	Auszug von	L-L	9600
leb. Leuk.	Ser.	5 %	174	leb. Leuk.	Ser.	5 % 16560
	„	20 %	64		„	20 % 60000
	„	conc.	174		„	conc. 75000

Kontrolle	L-L		∞	Kontrolle	L-L	∞
	Ser.	5 %	2880		Ser.	5 % ∞
	„	20 %	58		„	20 % ∞
	„	conc.	62		„	conc. ∞

Aussaat: 11640.

Ergebnis:

1. Die L-St. sind in ihrer Wirkung deutlich zu erkennen, am besten in L-L, aber auch noch in Ser. conc., wenn auch schwach.
2. Bei 6stündiger Einwirkungszeit ist die Wirkung deutlicher als bei 2stündiger, aber auch da ist sie deutlich erkennbar.
3. Unter A ist bei 20 % und conc. Serum im Auszug die Neutralisierung der Alexine deutlich erkennbar, bei 2stündiger Einwirkung besser als bei 6stündiger.
4. Erhitzen auf 60 Grad ½ Stunde lang schwächt die L-St., hebt ihre Wirkung aber nicht auf.

Versuch XII.

Anordnung: Leukocyten und Serum von 2 Meerschweinchen gemischt, sonst wie Versuch XI angesetzt, nur handelt es sich hier um 3stündige Auszüge. Auch hier sind die Leukocytenreste nicht verarbeitet.

Einwirkungszeit auf Bakterien 2 Stunden.

A.			B.		
Auszug von	L-L	6720	Auszug von	L-L	30000
leb. Leuk.	Ser. 5 %	4566	leb. Leuk.	Ser. 5 %	19200
	„ 20 %	13200		„ 20 %	24000
	„ conc.	12720		„ conc.	27600
Kontrolle	L-L	∞	Kontrolle	L-L	∞
	Ser. 5 %	45600		Ser. 5 %	33000
	„ 20 %	3600		„ 20 %	60000
	„ conc.	682		„ conc.	27600

Einwirkungszeit auf Bakterien 6 Stunden.

A.			B.		
Auszug von	L-L	2400	Auszug von	L-L	26760
leb. Leuk.	Ser. 5 %	6100	leb. Leuk.	Ser. 5 %	48000
	„ 20 %	5200		„ 20 %	fast ∞
	„ conc.	1440		„ conc.	∞
Kontrolle	L-L	∞	Kontrolle	L-L	∞
	Ser. 5 %	∞		Ser. 5 %	∞
	„ 20 %	4920		„ 20 %	∞
	„ conc.	192		„ conc.	∞

Aussaat: 40800.

Ergebnis: 3stündige Auszüge wirken nicht kräftiger als ½ stündige, höchstens in bezug auf die Alexine. Auch hier ist die Neutralisierung derselben bei Ser. 20 % und conc. in 2stündiger Einwirkung deutlich, bei 6 Stunden nicht.

Versuch XIII.

Anordnung: Die unter B angeführten Versuche sind vor dem Impfen ½ Stunde lang bei 58—60 Grad gehalten worden. Die ersten 3 Gruppen sind wie gewöhnlich angesetzt. Die nächsten 5 Gruppen sind ½ Stunde lang bei Zimmertemperatur (17 Grad) geschüttelt worden, dann zentrifugiert. Das Zentrifugat (Auszug) ist die abgeheberte Flüssigkeit, der Leukocytenrest wurde wieder mit L-L oder den entsprechenden Serumverdünnungen aufgefüllt und dann geimpft, bezw. erst erhitzt und dann geimpft (B). Die letzten 3 Gruppen sind bei 37 Grad ½ Stunde geschüttelt worden, dann ebenfalls die beiden Teile nach dem Zentrifugieren gesondert verarbeitet.

A.			B.		
Leb. Leuk.	L-L	12000	Leb. Leuk.	L-L	248
	Ser. 5 %	13200		Ser. 5 %	511
	„ 25 %	12200		„ 20 %	1500
	„ conc.	fiel aus		„ conc.	fiel aus
Gefror. L.	L-L	9960	Gefror. L.	L-L	744
	Ser. 5 %	13200		Ser. 5 %	1200
	„ 20 %	10200		„ 20 %	564
	„ conc.	6000		„ conc.	8760
Kontrolle	L-L	∞	Kontrolle	L-L	∞
(ohne Leuk.)	Ser. 5 %	36000	(ohne Leuk.)	Ser. 5 %	∞
	„ 20 %	150		„ 20 %	∞
	„ conc.	192		„ conc.	∞

½ Stunde bei Zimmertemperatur geschüttelt.

Leb. Leuk.	L-L	9840	Leb. Leuk.	L-L	990
(Rest)	Ser. 5 %	8760	(Rest)	Ser. 5 %	960
	„ 20 %	6240		„ 20 %	1560
	„ conc.	1440		„ conc.	6480
Zentrifugat	L-L	1920	Zentrifugat	L-L	66000
d. Vorigen.	Ser. 5 %	1260	d. Vorigen.	Ser. 5 %	48000
(Auszug)	„ 20 %	3240	(Auszug)	„ 20 %	38000
	„ conc.	2400		„ conc.	48000
Gefror. L.	L-L	48000	Gefror. L.	L-L	600
(Rest)	Ser. 5 %	14400	(Rest)	Ser. 5 %	1560
	„ 20 %	14400		„ 20 %	24000
	„ conc.	7200		„ conc.	25000
Zentrifugat	L-L	12000	Zentrifugat	L-L	25000
d. Vorigen.	Ser. 5 %	21120	d. Vorigen.	Ser. 5 %	31560
(Auszug)	„ 20 %	7400	(Auszug)	„ 20 %	37200
	„ conc.	77440		„ conc.	32400
Kontrolle	L-L	∞	Kontrolle	L-L	∞
	Ser. 5 %	6600		Ser. 5 %	∞
	„ 20 %	26		„ 20 %	∞
	„ conc.	149		„ conc.	∞

½ Stunde bei 37 Grad geschüttelt.

Gefror. L.	L-L	17040	Gefror. L.	L-L	1200
(Rest)	Ser. 5 %	24000	(Rest)	Ser. 5 %	3120
	„ 20 %	18000		„ 20 %	7320
	„ conc.	9600		„ conc.	15800

Zentrifugat d. Vorigen. (Auszug)	L-L	13900	Zentrifugat d. Vorigen. (Auszug)	L-L	30000
	Ser. 5 %	22800		Ser. 5 %	22000
	„ 20 %	7400		„ 20 %	22000
	„ conc.	2640		„ conc.	20000

Kontrolle	L-L	∞	Kontrolle	L-L	∞
	Ser. 5 %	48000		Ser. 5 %	∞
	„ 20 %	50		„ 20 %	∞
	„ conc.	107		„ conc.	∞

Aussaat: 42000.

Ergebnis: 1. Durch Gefrieren und Auftauen der Leukocyten lassen sich L-St. gewinnen (2. Gruppe), ebenso durch ½ stündiges Erhitzen auf 60 Grad. Durch letzteres Verfahren wird die Wirkung sehr gesteigert, sogar die gefrorenen Leukocyten gewinnen dadurch an keimtötender Kraft.

2. Stehenlassen bei 17 Grad macht L-St. frei, sie sind dann im Zentrifugat nachweisbar. Auch nach dem Ausziehenlassen ist der Rest von lebenden Leukocyten noch wirksam, jedoch läßt sich die Wirksamkeit durch ½ stündiges Erhitzen auf 60 Grad noch steigern; muß man doch bedenken, daß durch das Erhitzen die Lebenstätigkeit und damit die Phagocytose wegfällt.

3. Die Auszüge werden durch Erhitzen geschwächt.

4. Gefrorene Leukocyten wirken auch nach dem Ausziehen noch, aber schwach, auch hier verstärkt Erhitzen die Wirkung.

5. Der Auszug aus gefrorenen Leukocyten ist weniger wirksam als aus lebenden; auch hier tritt durch Erhitzen eine Verminderung der Wirkung ein.

6. Läßt man das Ausziehen der gefrorenen Leukocyten bei 37 Grad vor sich gehen, so bessert sich das Ergebnis nicht.

Versuch XIV.

Anordnung: Um die Auszüge herzustellen, wurden die Leukocyten und die Flüssigkeit zusammen ½ Stunde bei 17 Grad geschüttelt, dann zentrifugiert. Die abgeheberte Flüssigkeit (Zentrifugat, Auszug) und der mit den entsprechenden Flüssigkeiten wieder aufgefüllte Rest wurden gesondert verarbeitet. Alle unter B angeführten Versuche wurden vor dem Impfen ½ Stunde lang bei 60 Grad gehalten.

A.			B.		
Kontrolle (ohne Leuk.)	L-L	∞	Kontrolle (ohne Leuk.)	L-L	∝
	Ser. 5 %	601		Ser. 5 %	∞
	„ 20 %	149		„ 20 %	∞
	„ conc.	80		„ conc.	∞
Leb. Leuk. (Rest)	L-L	3360	Leb. L. (Rest)	L-L	239
	Ser. 5 %	4200		Ser. 5 %	211
	„ 20 %	1680		„ 20 %	48000
	„ conc.	1200		„ conc.	∞
Zentrifugat d. Vorigen. (Auszug)	L-L	620	Zentrifugat d. Vorigen. (Auszug)	L-L	10800
	Ser. 5 %	2400		Ser. 5 %	15600
	„ 20 %	6240		„ 20 %	21000
	„ conc.	250		„ conc.	36000
Gefror. L. (Rest)	L-L	30000	Gefror. L. (Rest)	L-L	3000
	Ser. 5 %	1500		Ser. 5 %	2160
	„ 20 %	205		„ 20 %	8240
	„ conc.	320		„ conc.	4920

Zentrifugat	L-L	40000	Zentrifugat	L-L	56800
d. Vorigen.	Ser. 5 %	19560	d. Vorigen.	Ser. 5 %	60000
(Auszug)	„ 20 %	3600	(Auszug)	„ 20 %	18720
	„ conc.	720		„ conc.	23200

Aussaat: 19900.

Ergebnis: 1. Der Auszug von lebenden Leukocyten ist gut wirksam, von gefrorenen weniger. Erhitzen schwächt ihn ab, hebt die Wirksamkeit aber nicht auf.

2. Der Rest der lebenden Leukocyten wirkt nach dem Ausziehen noch gut; Erhitzen verstärkt seine Wirksamkeit noch.

3. Gefrorene Leukocyten sind nach dem Ausziehen nur sehr schwach wirksam; Erhitzen verstärkt die Wirkung.

4. Der Auszug aus gefrorenen Leukocyten ist nur schwach wirksam, er verliert durch Erhitzen an Wirksamkeit.

Versuch XV.

Anordnung: Zu den unter B angeführten Versuchen wurden die Leukocyten vor dem Serumzusatz ½ Stunde lang auf 60 Grad erhitzt und zwar in Emulsion in der Waschflüssigkeit. Die zu dieser benutzte Flüssigkeitsmenge betrug 3—4 Tropfen. Um beim Erhitzen das Eintrocknen und damit eine Anreicherung des Salzgehaltes in der L-L zu verhindern, wurde soviel keimfreies destilliertes Wasser zugesetzt, daß die Menge immer die gleiche blieb. Die so inaktivierten Leukocyten wurden mit aktivem Serum behandelt; auch hier wurden die Reste der Auszüge verarbeitet. Wir machten bei 37 Grad Auszüge von 5 Minuten, einer halben und 3 Stunden.

Kontrolle	L-L	∞
	akt. Ser. 5 %	1920
	„ „ 20 %	840
	„ „ conc.	110

A. Lebende Leukocyten.			B. Erhitzte Leukocyten.		
Leb. L.	L-L	6960	Inakt. L.	L-L	7200
	akt. Ser. 5 %	5280		akt. Ser. 5 %	1800
	„ „ 20 %	7680		„ „ 20 %	1800
	„ „ conc.	3960		„ „ conc.	310

Dauer des Ausziehens 5 Minuten.

Leb. L.	L-L	6120	Inakt. L.	L-L	3000
(Rest)	akt. Ser. 5 %	6000	(Rest)	akt. Ser. 5 %	3600
	„ „ 20 %	8400		„ „ 20 %	720
	„ „ conc.	2760		„ „ conc.	149
Centrifugat	L-L	1800	Centrifugat	L-L	
d. Vorigen	akt. Ser. 5 %	2400	d. Vorigen	akt. Ser. 5 %	zerbrochen
(Auszug)	„ „ 20 %	1800	(Auszug)	„ „ 20 %	
	„ „ conc.	600		„ „ conc.	

Dauer des Ausziehens $^1/_2$ Stunde.

Leb. L.	L-L	5760	Inakt. L.	L-L	1440
(Rest)	akt. Ser. 5 %	8120	(Rest)	akt. Ser. 5 %	1800
	„ „ 20 %	5160		„ „ 20 %	840
	„ „ conc.	2400		„ „ conc.	88
Centrifugat	L-L	5400	Centrifugat	L-L	7680
d. Vorigen	akt. Ser. 5 %	1440	d. Vorigen	akt. Ser. 5 %	5520
(Auszug)	„ „ 20 %	1560	(Auszug)	„ „ 20 %	3840
	„ „ conc.	600		„ „ conc.	186

Dauer des Ausziehens 3 Stunden.

Leb. L.	L-L	5400	Inakt. L.	L-L	1080
(Rest)	akt. Ser. 5 %	4200	(Rest)	akt. Ser. 5 %	1920
	„ „ 20 %	2700		„ „ 20 %	233
	„ „ conc.	720		„ „ conc.	390
Centrifugat	L-L	513	Centrifugat	L-L	1320
d. Vorigen	akt. Ser. 5 %	1020	d. Vorigen	akt. Ser. 5 %	2760
(Auszug)	„ „ 20 %	7300	(Auszug)	„ „ 20 %	1200
	„ „ conc.	1200		„ „ conc.	360

Aussaat: 11150.

Ergebnis: 1. Inaktivierte Leukocyten wirken mit Ser. conc. besser als lebende, es werden durch das Erhitzen vermutlich die alexinneutralisierenden Stoffe vernichtet.

2. Der Auszug von 5 Minuten ist gut wirksam, auch der Rest bleibt es. Von den inaktivierten Leukocyten gilt das gleiche.

3. Zwischen den halbstündigen und dreistündigen Auszügen besteht, was die Wirksamkeit anbetrifft, kein wesentlicher Unterschied.

4. Die Reste der lebenden Leukocyten sind nach dem verschieden langen Ausziehen gleich gut wirksam, desgleichen die der inaktivierten Leukocyten.

5. Im Auszuge tritt bei den inaktivierten Leukocyten deutlich das Fehlen der Alexinbindung hervor.

Vergleicht man die beiden vorhergehenden Versuche, so fällt auf, daß ein Erhitzen der Leukocyten zugleich mit dem Serum eine viel stärkere Wirkung zeitigt, als wenn die Leukocyten allein erhitzt werden. Da bei dem Erhitzen in ersterem Versuche kein Wasser zugesetzt worden war,

so lag es nahe, den Grund in einem durch das Erhitzen gesteigerten Salzgehalt zu suchen, da ein Teil der Flüssigkeit verdunstet war, denn konzentrierte Salzlösungen wirken keimtötend. Als Kontrolle hierzu wurde Versuch XVI angesetzt.

Versuch XVI.

Anordnung: Es wurden lebende Leukocyten mit aktivem und inaktivem Serum behandelt, desgleichen inaktivierte Leukocyten auch mit aktivem und inaktivem Serum, und endlich wurden Leukocyten und Serum zusammen inaktiviert. Beim Erhitzen auf 60 Grad wurde das Volum durch Wasserzusatz konstant erhalten.

Kontrolle	L-L	∞	Kontrolle	L-L	∞
	akt. Ser. 5 %	6960		inakt. Ser. 5 %	∞
	„ „ 20 %	186		„ „ 20 %	∞
	„ „ conc.	0		„ „ conc.	∞
Leb. L.	L-L	1560	Leb. L.	L-L	620
	akt. Ser. 5 %	2760		inakt. Ser. 5 %	1440
	„ „ 20 %	1560		„ „ 20 %	1680
	„ „ conc.	600		„ „ conc.	3480
Inakt. L.	L-L	43	Inakt. L.	L-L	279
	akt. Ser. 5 %	483		inakt. Ser. 5 %	558
	„ „ 20 %	660		„ „ 20 %	3000
	„ „ conc.	720		„ „ conc.	7400
			Leuk. inaktiviert	L-L	720
			zusammen mit:	Ser. 5 %	840
				„ 20 %	2520
				„ conc.	13440

Aussaat: 41100.

Ergebnis: 1. Man sieht hier deutlich, daß ein Unterschied zwischen den lebenden und den inaktivierten Leukocyten besteht; wenn man bedenkt, daß bei den lebenden Leukocyten noch die Phagocytose dazukommt, so ist es augenscheinlich, daß durch $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 60 Grad den Leukocyten reichlich Leukocytenstoffe entzogen werden. Es soll aber nicht entschieden werden, ob die Stoffe, die direkt aus den lebenden gewonnen sind, völlig den durch Erhitzen dargestellten entsprechen. Es ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß Zerfallsprodukte der Leukocyten, die durch das Erhitzen gebildet werden und keimtötend wirken, hierbei in Erscheinung treten.

2. Ein Unterschied in der Art des Inaktivierens ist ohne Einfluß; man kann die Leukocyten in Emulsion erhitzen oder auch gleich mit dem Serum zusammen.

Wir haben noch eine Anzahl ähnlicher Versuche angestellt und in den verschiedensten Punkten Abänderungen vorgenommen (z. B. Temperatur, Zeit des Ausziehens usw.), aber wir sind bisher, da wir sie nicht vollständig durchführen konnten, noch zu keinem Ergebnisse gekommen, welches die Mitteilung dieser Versuche rechtfertigen könnte.

Zusammenfassung.

Wenn wir die letzten Versuche überblicken, so kommen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. L-St. lassen sich aus den Leukocyten in lebendem Zustande gewinnen, aber auch durch Gefrieren und Erhitzen auf 60 Grad ausziehen. Durch letzteres Verfahren wird eine besonders starke Wirkung erzielt.

2. L-St. werden durch $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 60 Grad nicht vernichtet, nur etwas geschwächt.
3. Eine Sonderstellung des 5 % Serums im Auszug, sei es aktiv oder inaktiv, wie sie Schneider angibt, haben wir nicht gefunden.
4. Die Zeit des Ausziehens ist auf die Wirkung von geringem Einfluß. 3 Stunden zeitigen keine wesentlich besseren Ergebnisse wie $^1/_2$ Stunde.
5. Neben den L-St. werden alexinneutralisierende Stoffe abgeschieden.
6. Diese Stoffe werden bei 60 Grad vernichtet.

Zum Schluß meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Professor Dr. Kruse für die liebenswürdige Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit und für die Übernahme des Referats meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literaturübersicht.

1.	Arima	Archiv f. Hygiene Bd. 73 1911.
2.	Bail	Berl. klin. Wochenschr. 1897 Nr. 41.
3.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 30 1897.
4.	„	Berl. klin. Wochenschr. 1898 Nr. 22 u. 42.
5.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 32 1898.
6.	„	Zentralblatt f. Bakt. Bd. 23 1898.
7.	„	Zentralblatt f. Bakt. Bd. 33 1903.
8.	„	Zentralblatt f. Bakt. Bd. 36 1904.
9.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 52 1905.
10.	Bail u. Pettersson	Zentralblatt f. Bakt. Bd. 33 u. 34 1903.
11.	Bail u. Suzuki	Archiv f. Hygiene Bd. 73 1911.
12.	Bail u. Weil	Archiv f. Hygiene Bd. 73 1911.
13.	Baumgarten	Münch. med. Wochenschr. 1908 Nr. 28.
14.	Buchner	Archiv f. Hygiene Bd. 10 1890.
15.	„	Münch. med. Wochenschr. 1892 Nr. 8.
16.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 17 1893.
17.	„	Münch. med. Wochenschr. 1894 Nr. 30 u. 37.
18.	„	Münch. med. Wochenschr. 1897 Nr. 47.
19.	„	Münch. med. Wochenschr. 1899 Nr. 39 u. 40.
20.	Bulloch	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 29 1901.
21.	Bürgers	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 50 1911.
22.	„	Zeitschr. f. Augenheilkunde Bd. 25 1911.
23.	„	Medizinische Klinik 1911 Nr. 19.
24.	Chrom	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 59 1911.

25. Denys u. Leclef — La Cellule T. XI 1895.
26. Denys u. Havet — La Cellule T. X 1894.
27. Denys u. Kaisin — La Cellule T. IX 1893.
28. Däubler — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 25 1899. [1911.
29. Dold — Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundheitsamt Bd. 36
30. Emmerich u. Löw — Wiener klin. Wochenschr. 1908 Nr. 23.
31. Esch — Zeitschr. f. Hygiene Bd 77 1914.
32. Friedberger — Handbuch v. Kolle u. Wassermann IV. I.
33. Fodor — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 7 1890.
34. Gézony — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 57 1911.
35. Gruber — Münch. med. Wochenschr. 1901 Nr. 49.
36. „ — Wiener klin. Wochenschr. 1903 Nr. 27 u. 40.
37. Gruber u. Futaki — Münch. med. Wochenschr. 1906 Nr. 6.
38. „ „ „ — Münch. med. Wochenschr. 1907 Nr. 6.
39. „ „ „ — Deutsche med. Wochenschr. 1907 Nr. 36.
40. Hahn — Archiv f. Hygiene Bd. 25 1895.
41. „ — Archiv f. Hygiene Bd. 28 1897.
42. „ — Handbuch von Kolle u. Wassermann IV. I.
43. Hasskin — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 12 1892.
44. Heim — Archiv f. Hygiene Bd. 40 1901.
45. Jakob — Zeitschr. f. klin. Medizin Bd. 32 1897.
46. Jochmann — Zeitschr. f. Hygiene Bd. 61 1908.
47. Kling — Zeitschr. f. Immunitätsforschung Bd. 7 1910.
48. Korschun u. Morgenroth — Berliner klin. Wochenschr. 1902 Nr. 37.
49. Kruse — Zieglers Beiträge Bd. 12 1893.
50. „ Bonaduce — Zieglers Beiträge Bd. 12 1893.
51. „ — Verhandlungen der Naturforscher-Gesellschaft Köln Bd. 2 1908.
52. Läwen — Mitteilungen aus den Grenzgebieten der Chir. u. Med. Bd. 19 1909.
53. Laschtschenko — Archiv f. Hygiene Bd. 37 1900.
54. Lazar — Wiener klin. Wochenschr. 1904 Nr. 16.
55. Le clef — La Cellule T. X 1894.
56. Löwit — Zieglers Beiträge Bd. 22 1897.
57. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 23 1898.

58. Löwy-Richter — Deutsche med. Wochschr. 1895 Nr. 13.
59. Lubarsch — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 6 1889.
60. Meissner — Zeitschr. f. Hygiene Bd. 72 1912.
61. Metschnikoff — Weils Handbuch der Hygiene Bd. IX.
62. „ — Kolle u. Wassermann IV. I.
63. Moro u. Uffenheimer — Archiv f. Hygiene Bd. 66 1908.
64. Moxter — Deutsche med. Wochenschr. 1899 Nr. 42.
65. Much — Jahrbuch des Hamburger Stadtkrankenhauses Bd. 12 1908.
66. Müller u. Jocharann — Münch. med. Wochenschr. 1906 Nr. 29 31 46.
67. Nadcleczny — Archiv f. Hygiene Bd. 37 1900.
68. Nakanishi — Münch. med. Wochenschr. 1900 Nr. 6 u. 20.
69. Neufeld u. Rimpau — Deutsche med. Wochenschr. 1904 Nr. 40.
70. Nuttal — Zeitschr. f. Hygiene Bd. 4 1888.
71. Pawlowsky — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 16 1894.
72. Pettersson — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 33 1903.
73. „ — Archiv f. Hygiene Bd. 43 1902.
74. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 36 1904.
75. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 39 1905.
76. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 40 1906.
77. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 42 1907.
78. „ — Zeitschr. f. klin. Medizin Bd. 63 1907.
79. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 45 1908.
80. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 46 1908.
81. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 50 1909.
82. „ — Zeitschr. f. Immunitätsforschung Bd. 7 1910.
83. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 54 1910.
84. „ — Zentralbl. f. Bakt. Bd. 60 1911.
85. Pfeiffer u. Marx — Zeitschrift f. Hygiene Bd. 27 1898.
86. „ „ Moreschi — Berl. klin. Wochenschr. 1906 Nr. 4.
87. Pribram — Wiener klin. Wochenschr. 1908 Nr. 30.
88. Schattenfroh — Archiv f. Hygiene Bd. 27 1896.
89. „ — Münch. med. Wochenschr. 1897 Nr. 1 u. 16.
90. „ — Archiv f. Hygiene Bd. 31 1897.
91. „ — Münch. med. Wochenschr. 1898 Nr. 16 u. 35.

92.	Schattenfroh	Archiv f. Hygiene Bd. 35 1899.
93.	Schallert	Zeitschr. f. Hygiene Bd. 77 1914.
94.	Schneider	Archiv f. Hygiene Bd. 65 1908.
95.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 70 1909.
96.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 75 1910.
97.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 81 1913.
98.	Schuster	Inauguraldissert. München 1894.
99.	Spät	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 59 1911.
100.	Toyosumi	Archiv f. Hygiene Bd. 71 1909.
101.	Trommsdorf	Archiv f. Hygiene Bd. 40 1901.
102.	Trumpp	Archiv f. Hygiene Bd. 33 1898.
103.	Van de Velde	La Cellule T. X 1894.
104.	„ „ „	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 25 1898.
105.	Weil	Archiv f. Hygiene Bd. 52 1905.
106.	„	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 43 u. 44 1907.
107.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 65 1908.
108.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 70 1909.
109.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 71 1909.
110.	„	Wiener klin. Wochenschr. 1911 Nr. 7.
111.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 74 1911.
112.	„	Archiv f. Hygiene Bd. 78 1913.
113.	Nunokawa	Zentralbl. f. Bakt. Bd. 54 1910.
114.	Toyosuni	Archiv f. Hygiene Bd. 71 1909.
115.	Yoshinaga	Archiv f. Hygiene Bd. 72 1910.

Lebenslauf.

Ich, Gerhard Huhle, bin geboren am 1. März 1891 zu Leipzig-Gohlis als Sohn des Lehrers Paul Huhle. Von Ostern 1901 bis Ostern 1910 besuchte ich die Petrischule (Realgymnasium) zu Leipzig, die ich mit dem Reifezeugnis verließ. Von Ostern 1910 an besuchte ich die Universität Leipzig; bestand nach 5 Semestern die ärztliche Vorprüfung und nach weiteren 5 klinischen Semestern die ärztliche Staatsprüfung am 19. März 1915. Gedient habe ich von April bis Ende September 1910 in Leipzig. Zu Beginn des Krieges trat ich als Feldunterarzt ein und machte den Feldzug durch Belgien und Frankreich mit. Ende Dezember wurde ich als krank nach Leipzig zurückgeschickt. Seit 1. Januar 1915 bin ich als Feldunterarzt am Reservelazarett II, Leipzig, St. Georg, tätig.